


**Process for the preparation of biologically active NGF by genetic engineering.**

Patent Number: ☒ [EP0544293](#), [A3](#), [B1](#)  
Publication date: 1993-06-02  
Inventor(s): STERN ANNE DR (DE); BARTKE ILSE DR (DE); LANG KURT DR (DE); NAUJOKS KURT DR (DE);  
RUDOLPH RAINER PROF DR (DE)  
Applicant(s): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)  
Requested Patent: ☒ [JP6327489](#)  
Application Number: EP19920120207 19921126  
Priority Number (s): DE19914139000 19911127  
IPC Classification: A61K37/02; C07K3/08; C12N1/21; C12N15/12; C12N15/58; C12N15/62  
EC Classification: [C07K14/48](#), [C07K1/113D2C](#), [C12N9/72B](#)  
Equivalents: ☒ [DE4139000](#), JP2611102B2, JP2637392B2, JP9023883  
Cited Documents: [EP0414151](#); [EP0450386](#); [EP0219874](#); [EP0544292](#)

**Abstract**

For the preparation of biologically active beta -NGF (nerve growth factor) by genetic engineering by expression of an appropriate DNA sequence in prokaryotes as host cells, a DNA sequence is used which is composed in the 5'-3'-direction of sequences which code for (a) methionine as a starting amino acid, (b) 3 to 5 amino acids of an n-terminal sequence of a protein which can be expressed in the host cells used with a high expression rate, (c) 4 to 10 amino acids from the pro sequence of the beta -NGF precursor and (d) the 118 amino acids of the mature beta -NGF which, after expression of this DNA sequence in insoluble aggregates of inactive beta -NGF obtained from E. coli, are converted into a soluble active form by (1) solubilisation, (2) if appropriate dialysis and/or derivatisation of the resulting beta -NGF with the oxidised form of a compound, whose reduced form contains sulphhydryl groups and whose oxidised form is a dimer of the compound bonded via a disulphide bridge, to give the mixed disulphide, and (3) naturation with the aid of a redox system consisting of a compound in oxidised and/or reduced form, whose reduced form contains sulphhydryl groups and whose oxidised form contains a dimer bonded via a disulphide bridge, and removing, if appropriate subsequently with the aid of a protease, the amino acids of the sequences (a) and/or (b) and/or (c) and/or up to 9 N-terminal amino acids of the sequence (d). An active beta -NGF is obtained which contains less than 5% of beta -NGF degradation products or beta -NGF modified by a Met radical at the N terminus and is preferably free of other mammalian cell proteins and can be shortened or lengthened at the N terminus. 

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-327489

(43) 公開日 平成6年(1994)11月29日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	Z N A H	8214-4B		
A 6 1 K 37/24	A A B			
	A A M	8314-4C		
C 0 7 K 13/00		8318-4H		
		9050-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 有 請求項の数22 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-318680	(71) 出願人	591215177 ベーリンガー マンハイム ゲーエムベー ハー ドイツ連邦共和国 68298 マンハイム, サントホファーシュトラッセ 116
(22) 出願日	平成4年(1992)11月27日	(72) 発明者	クルト ランク ドイツ連邦共和国 8122 ベンツパーク ランゴナー シュトラッセ 10
(31) 優先権主張番号	P 4 1 3 9 0 0 0 : 8	(72) 発明者	イルセ パルトケ ドイツ連邦共和国 8132 ツーツィンク フォン・ヒレーン・ウェック 2
(32) 優先日	1991年11月27日	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)
(33) 優先権主張国	ドイツ (D E)		

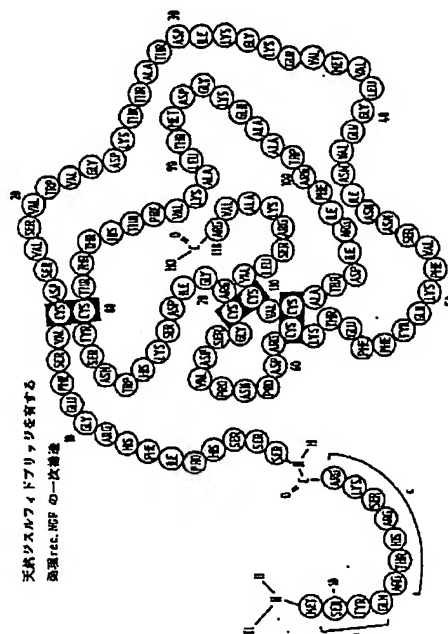
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子操作による生物活性 $\beta$ -NGFの生産方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 原核生物、特にE.coli中の活性ヒト $\beta$ -NGFのコスト上有効な簡単な生産を可能にする方法の提供。この方法により高い発現率を達成し、再生後に天然源から単離された $\beta$ -NGFと同じ活性を有するタンパク質を得ることが可能である。

【構成】 宿主細胞としての原核生物中の相当するDNA配列の発現による生物活性 $\beta$ -NGFの遺伝子操作による生産方法、組み換え修飾 $\beta$ -NGF、DNA配列並びに発現ベクターおよび治療組成物中の組み換え修飾 $\beta$ -NGFの使用。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 宿主細胞としての原核生物中の相当するDNA配列の発現による生物活性β-NGF（神経成長因子）の遺伝子操作による生産方法であって、

5'-3'方向に(a) 開始アミノ酸としてのメチオニン、  
(b) 使用される宿主中で高い発現率で発現し得るタンパク質のN-末端配列の3～5個のアミノ酸、(c) β-NGF前駆体のプロ配列からの4～10個のアミノ酸および(d) 成熟β-NGFの118個のアミノ酸をコードする配列を含むDNA配列を使用し、

発現後に得られた不活性β-NGFの不溶性凝集物を(1) 可溶化、(2) 所望により、得られたβ-NGFの透析および/または還元形態でスルフヒドリル基を有し、そしてその酸化形態が混合ジスルフィドを生成するためのジスルフィドブリッジにより結合された化合物の二量体である化合物の酸化形態による誘導体化および(3) 還元形態でスルフヒドリル基を有し、そしてその酸化形態がジスルフィドブリッジにより結合された二量体である酸化形態および/または還元形態の化合物を含む酸化還元系の助けによる再生により可溶性の活性形態に変換し、そして、所望により、配列(a) および/または(b) および/または(c) のアミノ酸を続いてプテアーゼの助けにより開裂することを特徴とする前記の生物活性β-NGFの生産方法。

【請求項2】 配列(b) および(c) の他に、配列(d) のN-末端側からの9個までのアミノ酸をまた開裂する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 アミノ酸(b) としてtPAのN-末端配列の3～5個のアミノ酸をコードするDNA配列を使用する請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 DNA配列がアミノ酸配列(b) Ser-Tyr-Glnをコードする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 (c) に相当するDNA配列が、成熟タンパク質の位置+1の直接前のβ-NGF前駆体中に配置されるβ-NGFのプロ配列のアミノ酸をコードする請求項1～4の一項に記載の方法。

【請求項6】 (c) に相当するDNA配列がアミノ酸配列Arg-Thr-His-Arg-Ser-Lys-Arg(SEQ ID NO 2)をコードする請求項5に記載の方法。

【請求項7】 可溶化が変性剤、特にグアニジウム塩酸塩または尿素を使用して行われる請求項1～6の一項に記載の方法。

【請求項8】 酸化されたグルタチオン(GSSG)、シスチンまたはシスタミンが誘導体化に使用される請求項1～7の一項に記載の方法。

【請求項9】 再生が酸化されたグルタチオン(GSSG)および/またはGSH、シスチンおよび/またはシステイン、シスタミンおよび/またはシステアミンを用いて行われる請求項1～8の一項に記載の方法。

【請求項10】 シスタミン、GSSGまたはシスチン、ま

たは酸化還元系シスタミン/システアミン、GSH/GSSGもしくはシスチン/システインによる再生が、先に誘導体化を行わないで、行われる請求項8に記載の方法。

【請求項11】 可溶化、透析、誘導体化および再生が0～30℃の温度で行われる請求項1～10の一項に記載の方法。

【請求項12】 再生が2～10℃で2～60時間の期間にわたって行われる請求項11に記載の方法。

【請求項13】 配列(a)、(b) および(c) の開裂、並びに配列(d) の9個までのアミノ酸の開裂が、トリプシン、エンドプロテイナーゼArg C または同種特異性のプロテアーゼを用いて行われる請求項1～12の一項に記載の方法。

【請求項14】 5%未満のβ-NGF分解生産物またはN-末端でMet 残基により修飾されたβ-NGFを有し、好ましくはその他の哺乳類細胞タンパク質を含まないことを特徴とする組み換え手段により生産されたβ-NGF。

【請求項15】 成熟ヒトβ-NGFと較べて、アミノ末端が、高い発現率で宿主細胞としての原核生物中で発現し得るタンパク質の更に3～5個のアミノ酸だけ長いN-末端配列を有し、またヒトβ-NGFの前駆体のプロ配列の4～10個のアミノ酸を有することを特徴とするN-末端延長による組み換えβ-NGF。

【請求項16】 N-末端配列としてt-PAのN-末端アミノ酸配列Ser-Tyr-Gln(SEQ ID NO. 3)を有する請求項15に記載のN-末端延長による組み換えβ-NGF。

【請求項17】 β-NGF前駆体中で成熟ヒトβ-NGFの初期アミノ酸+1の直接前に配置されているアミノ酸、特に最後の7個のアミノ酸をプロ配列(c) として有する請求項15または16に記載のN-末端延長による組み換えβ-NGF。

【請求項18】 通常N-末端側にある118個のアミノ酸が9個までのアミノ酸だけ短縮されている短縮N-末端を有する組み換えβ-NGF。

【請求項19】 請求項15～17の一項に記載のN-末端延長による組み換えβ-NGFをコードするDNA配列。

【請求項20】 プラスミドpNGF1。

【請求項21】 医薬調製に於ける請求項14～18の一項に記載のN-末端で延長または短縮されている組み換え手段および/または組み換えβ-NGFにより生産されたβ-NGFの使用。

【請求項22】 通常の担体物質および助剤と組み合わせて、活性成分として、請求項14～18の一項に記載のN-末端で延長または短縮されている組み換え手段および/または組み換えβ-NGFにより生産されたβ-NGFを含む治療組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、宿主細胞としての原核生物中の相当するDNA配列の発現による生物活性β-NGF

の遺伝子操作による生産方法、組み換え修飾 $\beta$ -NGF、DNA配列、並びに発現ベクターおよび治療組成物中の組み換え修飾 $\beta$ -NGFの使用に関する。

【0002】

【従来の技術】神経成長因子(NGF)は約130,000ダルトンの分子量を有する多成分タンパク質である。それは三つのサブユニット $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ を含む。しかしながら、知覚ニューロンおよび交感ニューロンの成長に影響するその能力は単に $\beta$ サブユニットによるものである。生物活性が $\alpha$ サブユニットに特有のものであると考えることは今までのところ可能ではなかったし、一方、 $\gamma$ サブユニットは長い前駆体として最初に合成される $\beta$ -NGFの処理に重要な役割を果たす或る種の細胞種中に少なくともある。成熟 $\beta$ -NGFはおそらく118個のアミノ酸を含む。それは3個のジスルフィドブリッジを含み、そしてグリコシル化されていない。生物活性であるためには、それは二量体として存在する必要がある。

【0003】神経成長因子は神経疾患、例えば、アルツハイマー病またはパーキンソン病の治療に特に重要である。それ故、cDNA配列が最初に1983年(Ullrichら、Nature 303巻(1983)、821-825)に記載された後、タンパク質を遺伝子操作により生産しようとする試みが既になされている。こうして、 $\beta$ -NGFのDNAおよびアミノ酸配列そして仮説上のE.coli中の発現が欧州特許第0121338号明細書に記載されている。この欧州特許は $\beta$ -NGFの遺伝子の単離方法およびその配列をこれから得た方法を示しているが、発現系がE.coli中の直接の発現に使用されたことが単に記載されたにすぎなかった。しかしながら、活性タンパク質をこの手段により得ることは可能ではなかった。

【0004】欧州特許出願第0329175号明細書は、トロロンピン開裂の認識配列が $\beta$ -NGF遺伝子の前に配置されている融合遺伝子を使用する活性ヒト $\beta$ -NGFの生産を記載している。この場合、その融合は融合タンパク質の発現後にトロロンピンにより開裂される。この方法の欠点の一つは、とりわけ、生物活性 $\beta$ -NGFの低収率である。欧州特許出願第0370171号明細書は、バクテリオファージ発現系を使用する活性 $\beta$ -NGFの生産方法を記載している。この方法では、ウイルスで感染された昆虫細胞が発現に使用される。しかしながら、このような細胞の培養は非常に複雑であり、またそれらが商業上重要な生産細胞として使用し得ることを示すことがまだ可能ではなかった。

【0005】真核生物からの活性 $\beta$ -NGFの生産がBiochem. Biophys. Research Commun. 171(1990)116-122および欧州特許出願第0414151号明細書に記載されている。しかしながら、真核細胞中の組み換えタンパク質の発現は複雑であり、かつ費用がかかる。E.coli中のネズミ $\beta$ -NGFの発現がGene 70(1988)、57-65頁に記載されている。しかしながら、生物活性 $\beta$ -NGFの収率が非常に小さかった。

【0006】欧州特許出願第0450386号明細書はE.coli

からの $\beta$ -NGFの生産方法を記載している。しかしながら、この方法で得られた生産物は約85:15の比の天然配列を有する $\beta$ -NGFとN-末端メチオニン残基を有する $\beta$ -NGFの混合物である。酵母中のヒト $\beta$ -NGFの発現がGene 83(1989)、65-74頁に記載されている。また、この場合には、発現がごくわずかであり、しかも得られた $\beta$ -NGFの活性が非常に弱いものであるにすぎない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】それ故、本発明の目的は、原核生物、特にE.coli中の活性ヒト $\beta$ -NGFのコスト上有効な簡単な生産を可能にする方法を提供することであり、その方法により高い発現率を達成し、そして再生後に、天然源から単離された $\beta$ -NGFと同じ活性を有するタンパク質を得ることが可能である。

【0008】

【課題を解決するための手段】その目的は、本発明によれば、宿主細胞としての原核生物中の相当するDNA配列の発現による生物活性 $\beta$ -NGF(神経成長因子 $\beta$ サブユニット)の遺伝子操作による生産方法により達成され、その方法では、5'-3'方向に(a)開始アミノ酸としてのメチオニン、(b)使用される宿主中で高い発現率で発現し得るタンパク質のN-末端配列の3~5個のアミノ酸、(c) $\beta$ -NGF前駆体のプロ配列からの4~10個のアミノ酸および(d)成熟 $\beta$ -NGFの118個のアミノ酸コードする配列を含むDNA配列を使用し、発現後に得られた不活性 $\beta$ -NGFの不溶性凝集物を(1)可溶化、(2)所望により、得られた $\beta$ -NGFの透析および/または還元形態でスルフィド基を有し、そしてその酸化形態が混合ジスルフィドを生成するためのジスルフィドブリッジにより結合された化合物の二量体である化合物の酸化形態による誘導体化および(3)還元形態でスルフィド基を有し、そしてその酸化形態がジスルフィドブリッジにより結合された二量体である酸化形態および/または還元形態の化合物を含む酸化還元系の助けによる再生により可溶性の活性形態に変換し、そして、所望により、配列(a)および/または(b)および/または(c)のアミノ酸を続いてプテアーゼの助けにより開裂する。

【0009】本発明の方法の使用は、 $\beta$ -NGFが原核生物中で高収率で生産されることを可能にする。原核生物中で、タンパク質は最初に不溶性凝集物、所謂封入体(IE)の形態で生じ、次に可溶性の活性形態のみに変換される。このようにして、付加的なN-末端アミノ酸配列(N-末端で延長された $\beta$ -NGF)を含む生物活性 $\beta$ -NGFが得られ、これがまた本発明の主題である。プテアーゼの助けによる付加的なアミノ酸(これらは成熟 $\beta$ -NGF鎖のアミノ酸の前に存在する)の開裂後に、成熟ヒト $\beta$ -NGFと同じであるタンパク質を得ることが次に可能である。ヒト $\beta$ -NGFはグリコシル化されていないので、原核生物中の生産はこの場合には天然生産物と比較して相違を生じない。驚くことに、9個までの最初のN-末端アミノ酸が

$\beta$ -NGFの活性を失わないで開裂し得ることが判明した。このようなN-末端で短縮された $\beta$ -NGFおよびその生産方法がまた本発明の主題である。

【0010】本発明の方法に使用されるDNA配列は、Ulrichら、Nature303(1983),821-825により記載されたものに相当する。これに関して、cDNAは通常の方法で生産し得る。また、天然遺伝子のエクソンからなるDNA配列を合成することが可能である。本発明の方法でタンパク質の高収率を得るために、開始アミノ酸メチオニンのコドンだけでなく、使用される宿主株中でよく発現されるタンパク質のN-末端配列の3〜5個のアミノ酸に相当することが知られているアミノ酸のコドンは、 $\beta$ -NGFのDNA配列の前に配置される。特にE.coli株を使用する場合には、これはt-PA(組織プラスミノゲンアクチベーター)のN-末端配列のアミノ酸Ser-Tyr-Gln-Val-Ile(SEQ ID NO4)をコードするDNA配列であることが好ましい。これらは特にアミノ酸Ser-Tyr-Gln(SEQ ID NO3)をコードするコドンである。

【0011】その他に、 $\beta$ -NGF前駆体のプロ配列からの少なくとも一部のアミノ酸が使用される場合、発現率に対して顕著な影響があることが判明した。これに関して、コドンは成熟 $\beta$ -NGFのアミノ酸配列の直接前の前駆体中に配置されるアミノ酸をコードするDNA配列中に導入されることが好ましい。特に、プロ配列の最後の7個のアミノ酸(Arg-Thr-His-Arg-Ser-Lys-Arg)(SEQ ID NO2)をコードするコドンが使用される。

【0012】本発明の好ましい実施態様では、発現は宿主細胞としてのE.coli、特に株E.coli C600<sup>+</sup>(DSM 5443)中で行われる。DNA配列の発現に必要な因子は当業者には知られており、これらはとりわけプロモーター、リボソーム結合部位等を含み、これらは発現に通常使用されるベクターに存在する。しかしながら、本発明の方法では、誘導プロモーターが使用されることが好ましく、そしてこのプロモーターの誘導は対数増殖期中に行われることが好ましい。この手段により、特に高いタンパク質収率を得ることが可能である。何となれば、外来タンパク質の発現は初期増殖期中に宿主細胞の死滅を既にもたらさないからである。このような誘導プロモーターの例はtacプロモーター(これはIPTGの添加により誘導し得る)、trpプロモーターまたは $\lambda$ P<sub>1</sub>プロモーターである。

【0013】E.coli中の発現後に封入体の形態で蓄積するタンパク質の可溶性、誘導体化および再生(これらはまた一緒にして再生と称される)は既に知られており、例えば、欧州特許出願第0219874号明細書に記載されている。可溶性(それは不活性な可溶性タンパク質をもたらす)は、変性剤、好ましくはグアニジウム塩酸塩または尿素を使用して行われ、この場合、4〜6モル/l(グアニジウム塩酸塩の場合)および5〜8モル/l(尿素の場合)の変性剤の濃度が良好な結果を生じる。

【0014】起こりうる透析(これは絶対に必要ではないが、行われることが好ましい)の後に、タンパク質は次に所望により誘導体化されて所望のジスルフィドを生成し得る。好ましい実施態様では、誘導体化は本発明の方法ではGSSG、シスタミンまたはシスチンを使用して行われる。これらの化合物は75ミリモル/lまでの量でインキュベーション混合物に添加されることが好ましい。

【0015】任意の誘導体化(再生はまた誘導体化しないで可能である)の後に、介在の透析が再度行われる。また、可溶性タンパク質を再生する前に透析することが可能である。再生は2モル/l未満、好ましくは0.5モル/l未満の尿素濃度を使用することが好ましく、そしてそれはトリス塩基もしくはトリス塩および/またはアルギニンの存在下で(欧州特許出願第0219874号と同様)欧州特許出願第91 919 945.5号と同様にして行われる。この方法を8〜10のpH範囲で行うことが好ましい。

【0016】可溶性タンパク質または誘導体化タンパク質を最終の活性な可溶性形態に変換する再生は、本発明によれば、酸化グルタチオン(GSSG)および/またはGSH、シスチンおよび/またはシステイン、シスタミンおよび/またはシステアミンを用いて行われることが好ましい。誘導体化が行われない場合、本発明の方法ではシスタミン、GSSGまたはシスチン、または酸化還元系シスタミン/システアミン、GSH/GSSGまたはシスチン/システインで再生することが特に好ましい。しかしながら、タンパク質が混合ジスルフィドに変換された場合、即ち誘導体化された場合、それは還元化合物のみで再生されることが好ましい。この反応条件およびその他の反応条件に有利な濃度はオリエンテーリング実験により容易に確立し得る。

【0017】欧州特許出願第0241022号のバルス再生を行うことが特に好ましい。温度は全再生の反応混合物中で0〜30℃であることが適当である。しかしながら、2〜10℃の温度が再生のために保たれることが好ましい。何となれば、活性 $\beta$ -NGFの収率は温度を低下するにつれて増大するからである。再生は2〜60時間行われることが好ましい。延長された再生は生物活性タンパク質の高収率をもたらす。

【0018】先の操作により得られた修飾された(N-末端で延長された)組み換え $\beta$ -NGFから天然 $\beta$ -NGFに相当する形態を得るために、配列(a)、(b)および(c)は本発明によればトリプシン、エンドプロテイナーゼArg Cまたは同種の特異性のプロテアーゼで開裂される。アミノ酸メチオニン(配列a)は既にE.coli自体のプロテアーゼにより開裂される。

【0019】N-末端で9個までのアミノ酸だけ短縮されている組み換え $\beta$ -NGFを得るために、トリプシンまたはトリプシンと同様の特異性を有するプロテアーゼが添加される。本発明の方法を使用して、天然ヒト $\beta$ -NGFと同じ活性を有し、かつ配列(a)、(b)および(c)により延

長され、またはN-末端で9個までのアミノ酸だけ短縮されている組み換え生物活性 $\beta$ -NGFを生産することが可能である。本発明の方法の主な利点は、均一なタンパク質が再現性よく得られ、これらは例えば欧州特許出願第0450386号明細書に記載されるようなタンパク質混合物（N-末端メチオニン残基を有する $\beta$ -NGFとN-末端メチオニン残基を有しない $\beta$ -NGFの混合物）ではないことである。エンドプロテイナーゼArg CまたはプロテアーゼKex2(PNAS 86(1989)1434-1438; Biochemistry40(1991)367-372)が開裂に使用される場合、天然配列を有する組み換え $\beta$ -NGFが得られ、これは単離するのに容易であり（例えば、モノ-Sカラムにより）、そして次に5%以下の修飾 $\beta$ -NGFまたは $\beta$ -NGF開裂生産物の不純物を含む。組み換え $\beta$ -NGFは2%以下のこれらの不純物を含むことが好ましい。プロテアーゼKex2が使用される場合、その他にその他の哺乳類細胞タンパク質を全く含まない $\beta$ -NGFを得ることが可能である。プロテアーゼ開裂は再生生産物の精製の前または後に行うことができる。

【0020】こうして、更に本発明は、組み換え手段により生産され、5%以下、好ましくは2%以下の修飾 $\beta$ -NGFまたは $\beta$ -NGF開裂生産物の形態の不純物を含み、好ましくはその他の哺乳類細胞タンパク質を含まない天然配列を有する単離 $\beta$ -NGFに関する。本発明によれば、タンパク質が高収率で得られ、かつ高活性を有する。本発明の方法の操作（この操作では、発現後に得られた不溶性凝集物が最初に再生され、次に配列(a)、(b)および(c)のみが開裂される）は、生物活性に必要であるタンパク質の正確な折りたたみおよびまた二量体化が開裂の前に既に行われていることを保証する。この手段により、例えばトリプシンに関するタンパク質内のプロテアーゼ開裂部位は最早接近可能ではなく、かつ配列(a)、(b)および(c)および、所望により、N-末端の9個までのアミノ酸のみを開裂することが可能である。

【0021】天然有効性の活性タンパク質を生成するための二量体化は再生中に行われる。N-末端で延長され、または短縮された組み換え $\beta$ -NGFまたはプロ配列を開裂した後に得られた分子のいずれもが、抗体による認識に関してマウスからの天然2.5S-NGFと異ならない。それ故、更に本発明は、成熟ヒト $\beta$ -NGFと比較して、使用される原核生物宿主細胞中で高い発現率で発現し得るタンパク質のN-末端配列のアミノ末端で更に3~5個のアミノ酸を有し、またヒト $\beta$ -NGFのプロ配列の4~10個のアミノ酸を有するN-末端で延長された組み換え $\beta$ -NGFに関する。

【0022】これに関して、本発明のN-末端で延長された組み換え $\beta$ -NGFはtPAのプレプロ配列、特にアミノ酸配列Ser-Thr-Gluを含むことが好ましい。本発明により修飾された $\beta$ -NGFは、プロ配列としての成熟アミノ酸配列の前の $\beta$ -NGF前駆体中のプロ配列の最後のアミノ酸、特に最後の7個のアミノ酸を含むことが好ましい。特に

好ましい修飾 $\beta$ -NGFのアミノ酸配列が図2に示される。

【0023】また、本発明は、本発明によりN-末端で延長された組み換え $\beta$ -NGFをコードするDNA配列に関するだけでなく、本発明のDNA配列を含む発現ベクターに関する。これに関して、プラスミドの如き当業者知られているベクターが本発明の発現ベクターとして好適である。このような発現ベクターは、特別な宿主生物中の発現に必要な全ての成分、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、終止配列等を含む。本発明によれば、発現ベクターは誘導プロモーターを含むことが好ましい。

【0024】このような本発明の発現ベクターは例えば図1に図示されているプラスミドpNGF1である。N-末端で延長または短縮された $\beta$ -NGFはニューロンに対して天然 $\beta$ -NGFと同じ効果を有する。それ故、また本発明は、医薬中のその使用に関するだけでなく、この目的のために組み換え手段により本発明により生産された $\beta$ -NGFの使用に関する。

【0025】更にまた、本発明は、通常の担体および助剤の他に、活性成分として、組み換え手段により生産され、かつN-末端で延長または短縮されている本発明の組み換え $\beta$ -NGFを含む治療組成物に関する。本願で記載されたプラスミドおよび微生物は“Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSM)”, Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweigに寄託され、下記の寄託番号を有する。

E.coli C 600*	DSM5443
E.coli C 600* 中のpUBS 520	DSM6786
E.coli C 600* 中のpNGF1/pUBS 520	DSM6785

図面および配列プロトコルと組み合わせて以下の実施例は本発明を更に詳しく説明する。

#### 図面の説明

##### 図1

この場合には本発明のプラスミドpNGF1を略図形態で示す。

##### 【0026】図2

DNAレベルでコードされ、かつ配列b (Ser-Tyr-Gln(SEQ ID NO 3)) およびc (Arg-Thr-His-Arg-Ser-Lys-Arg (SEQ ID NO 2)) を有する本発明の組み換え $\beta$ -NGFの一次構造を示す。

##### 図3

再生溶液中のグアニジウム塩酸塩濃度に対する再生収率の依存性を示す。再生は、20mgのIB/mlを含む透析可溶化剤を、種々の濃度のグアニジウム塩酸塩を含む0.7モル/lのアルギニン、1.0モル/lの尿素、0.1モル/lのトリリス、2ミリモル/lのEDTA、5ミリモル/lのシステアミン、1ミリモル/lのシスタミン、pH8.7、4℃中で1/100に希釈することにより行われる。

##### 【0027】図4

再生溶液中のタンパク質濃度に対する再生収率の依存性を示す。再生は、50mgのIB/mlを含む透析可溶化剤を、

10

20

30

40

50

0.7 モル/lのアルギニン、2.0 モル/lの尿素、0.1 モル/lのトリス、2 ミリモル/lのEDTA、5 ミリモル/lのシステアミン、1 ミリモル/lのシスタミン、pH8.7 中で1/1 2.5~1/1000に希釈することにより行われた。再生溶液中のグアニジウム塩酸塩を、可溶化剤の添加後に全ての溶液が0.48モル/lのグアニジウム塩酸塩を含むように、可溶化剤の添加前に増加した。

#### 【0028】図5

再生溶液のpHに対する再生収率の依存性を示す。再生は、50mgのIB/mを含む透析可溶化剤を、0.7 モル/lのアルギニン、2 モル/lの尿素、0.1 モル/lのトリス、2 ミリモル/lのEDTA、5 ミリモル/lのシステアミン、1 ミリモル/lのシスタミン、pH8.0 ~10.5、4 °C中で1/200に希釈することにより行われた。

#### 【0029】図6

50ミリモル/lのトリス/HCl、1 ミリモル/lのEDTA、pH7.5 中の修飾された(N-末端で延長された)組み換えβ-NGFのUVスペクトルを示す。

#### 図7

マウスからの2.5 S-NGFと比較した組み換えβ-NGFのSDSゲルのクーマシーブルー染色を示す。

#### 【0030】図8

修飾された(N-末端で延長された)組み換えβ-NGFのHPLC溶離ダイアグラムを示す。

#### 図9

組み換え(N-末端で延長された)β-NGF(図9a)およびマウスからの2.5 S-NGF(図9b)のスペロース6溶離ダイアグラムを示す。

#### 【0031】図10

未消化の組み換えβ-NGFのモノS溶離ダイアグラムを示す。

#### 図11

トリプシンによる消化後のダイアグラムを示す。

#### 図12

エンドプロテイナーゼArg Cによる消化後のダイアグラムを示す。SEQ ID NO 1はN-末端配列SEQ ID NO 2および3を有する組み換えβ-NGFのアミノ酸配列を示す。SEQ ID NO 2はβ-NGF前駆体のプロ配列の一部を示す。SEQ ID NO 3はtPAのN-末端アミノ酸配列の一部を示す。SEQ ID NO 4はtPAのN-末端アミノ酸配列の一部を示す。SEQ ID NO 5および6はpNGF1を構成するためのオリゴヌクレオチドを示す。SEQ ID NO 7はrec.NGFのN-末端アミノ酸配列を示す。SEQ ID NO 8~10は種々のN-末端で短縮されたβ-NGF誘導体のN-末端アミノ酸配列を示す。

#### 【0032】

##### 【実施例】

##### 実施例1

組換え体β-NGF(recβ-NGF、β-NGFミニ融合)のE. coliにおける発現

##### a) 発現プラスミドの構築

発現プラスミドを構築するために三調製物をライゲートした。調製物AはプラスミドpBTac1の約4.6kbの大きなEcoRI/BamHIフラグメントを構成している。このプラスミドに関しては、pBTac1を二つの制限酵素EcoRIとBamHIで処理した。制限混合物をアガロースゲル上で分離した。約4.6kbのサイズを有するフラグメントを切り出し、DNAをゲルから溶出した。調節物BをプラスミドpUC18-NGF(British Biotechnology, Code BBG26)の制限より構築した。二つの酵素BspMIとBamHIをその制限のために用いた。制限混合物をゲル電気泳動により分離し、370bpのBspMI/BamHIフラグメントを調製用に入手した。

【0033】下記の配列を有する、合成で生成した2本のオリゴヌクレオチドをアニールすることにより調製物Cを生成した。

オリゴヌクレオチド1:

5'-AATTCTTATGCTTACCAAGAAGCTACCGTAGCAAGCC-3'

(配列番号5)

オリゴヌクレオチド2:

5-ATGAGCGCTTGCTACGGTGAGTTCTTTGTAAGACATAAG-3'

(配列番号6)

10μgにつき各オリゴヌクレオチド2μgをアニーリング反応に用いた;オリゴヌクレオチドを68°Cで10分間インキュベートし、室温までさました。三調製物を既知の方法によりライゲートし、プラスミドpUBS520(Brinkmannら、1989、Gene85、109-114に記載)と共にE. coli C600(DSM5443)を用いて形質転換した。所望のクローンはアンピシリンとカナマイシンでの選択により見つかり得る。生成したプラスミドpNGF1は、図1に記載されており、出発プラスミドpBTac1とは、特に第2のScaI切断部位を含むところが異なっている。コードされたタンパク質のアミノ酸配列は図2に示されている。

##### b) 発現研究

生成したクローンのうちのひとつをβ-NGFミニ融合の発現に関して調べた。これのために細胞を37°Cで光学密度0.4(550nmで測定)になるまで培養した。β-NGF融合タンパク質の発現を5m mol/lのIPTG添加により誘発した。細胞をさらに4時間インキュベートし、続いて遠心より濃縮した。封入体を既知の方法(実施例2参照)により調製し15%SDSポリアクリルアミドゲルで分析した。この方法により、全タンパク質に対して20%の発現収率を測定することが可能となった。

##### 実施例2

##### 封入体(=IBs)の調製

rec.β-NGFを含むIBsの調製に関して、実施例1に記載された発現株E. coli C600をプラスミドpNGF1と共に10l発酵槽で8時間発酵した。発酵を始めてから約4時間後の対数増殖期にIPTGを添加することによりβ-NGFの発現を誘発した。

【0034】8時間の発酵の後、遠心により690gのバイオマスを収穫した。バイオマスを3.5 lの0.1mol/l トリス/HCl, pH7に懸濁し、0.3gのリゾチームを添加した後0℃で20分間インキュベートした。続いて完全な細胞溶解を600バーの高圧分散により行った。DNアーゼを0.1mg/mlの最終濃度になるように、そしてMgSO<sub>4</sub>を2 mmol/lの最終濃度になるように溶解液に加え、溶液を20℃で30分間インキュベートした。DNアーゼ処理の後、溶液を等量の0.1 mol/l トリス/HCl, 6%トリトンX-100, 1.5mol/l NaCl, 60mmol/l EDTA, pH7.0で希釈し、水浴中で20分間インキュベートした。続いて不溶解性成分 (IBs)を遠心により分離した。沈澱物を1 lの0.5mol/l グアニジニウムHCl (GdmCl), 20mmol/l EDTA, pH4.5中に懸濁した。20℃で20分間インキュベートした後、IBsを再び遠心することにより収穫した。続いて沈澱物を1.5 lの0.1 mol/l トリス/HCl, 20mmol/l EDTA, pH6.5中に再懸濁した。20℃で30分間のインキュベートの後、さらに別の遠心によりIBsを沈澱物中に得た。

【0035】IBs中のβ-HGFの割合を測定するために、500 mgのIBs(含水重量)を6 mol/l GdmCl, 0.1 mol/l トリス/HCl, 0.1mol/l DTE, 5 mmol/l EDTA, pH8.5の溶液で10mlにし、1時間懸濁した。溶液のタンパク質含有量は校正タンパク質としてBSAを用いBradford (Bradford, M.M., Anal. Biochem. 1976, 72, 248)のタンパク質測定法により測定した。SDSゲル電気泳動を用いてタンパク質を分離した後溶解したIBs中の全タンパク質に対するβ-HGFの割合を試料レーンをデンストメーター測定により測定した。10 l発酵ブロスから単離されたIBsは6.0gのβ-HGFを含んでいた。

### 実施例3

#### rec.β-NGFの可溶化と誘導体化

##### a) 可溶化物の生成

IBsを6 mol/l GdmCl, 0.1 mol/l DTE, 5 mmol/l EDTA, 0.1 mol/l トリス/HCl, pH8.5の溶液に5-50g IB/lの濃度で懸濁し、25℃で1時間の攪拌した。いくつかの場合、この方法で調製された可溶化物をすぐに次の再生に用いた。

##### b) 透析可溶化物の生成

別の方法として可溶化物のpHをHCl (25%)でpH3に調整して、酸性溶液を6mol/l GdmCl, 5 mmol/l EDTA, pH3で数回透析した。この透析物を再生およびそれに続く誘導体化のために用いた。

##### c) 誘導体の生成

誘導体(混合したジスルフィド)の生成のために、透析可溶化物のpHを5N NaOHの添加によりpH8.5に調整した。続いてそれを1容量の6 mmol/l GdmCl, 0.2 mol/l トリス/HCl, 5 mmol/l EDTA, pH8.5の溶液で希釈し、固体状の酸化グルタチオン (GSSG), シスタミンまたはシスチンを75 mmol/lの濃度になるまで加え20℃で1時間インキュベートした。シスチンの場合、インキュベーション

はpH8.5の代りにpH9.5で行った。続いて溶液のpHを25% HClでpH3に調整し、6mol/l GdmCl, 1 mmol/l EDTA, pH3.0で数回透析した。

### 実施例4

#### rec.β-NGFの再生

実施例3で生成された可溶化物と誘導体から生物学的に活性のあるβ-NGFを調製するために、不活性で可溶性形態のβ-NGFを含む溶液を種々の再生緩衝中で12.5-1000倍に希釈した。最適再生条件を決定するため、タンパク質濃度、pH、温度およびアルギニン、トリス/HCl、尿素、GdmCl、酸化グルタチオン (=GSSGまたはGSH)、シスチン、システイン、シスタミン、システアミンの濃度を変化させた。結果を表1-3および図3-5に示す。

【0036】再生溶液中の再生された生物学的活性のあるβ-NGFの濃度は、β-NGFにより刺激される、ニワトリ胚の分裂した背根神経節からの感覚性ニューロンの樹状突起(=DRG 検定=背根神経節アッセイ) Levi-Montalcini, R., Meyer H. and Hamburger, V. 1954, Cancer Res., 14, 49-57; Varon, S., Nomura, J., Perez-Polo, J.R. and Shooter, E.M., 1972, Meth. in Neurochemistry 3, 203-229; EP-A 0335 673, p. 14-15, 実施例C)を発芽させる能力を利用して決定し、サイドイッチ酵素免疫アッセイ (β-NGF-ELISA) も用いた。

【0037】DRG 検査のために、24時間インキュベーションした後再生溶液を50 mmol/l トリス/HCl pH7.5で透析し、続いて遠心により不純物を除去した。純粋な上清または培地 (F14 培地; Coon, M.G. and WeiB, M.C., 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 852-859)で希釈された上清の100μl アリコート培地 750μl および分裂神経節の細胞懸濁 150μl と24ウェル細胞培養プレート (Costar Company) 中で混合し、37℃で48時間インキュベートした。形成した樹状突起を有する細胞の数を生物学的活性の尺度として定量化した。マウスの顎下腺からの2.5S-NGF (Boehringer Mannheim Company)の既知の濃度を有する溶液を対照標準として用いた。

【0038】β-NGF-ELISAのために、50 mmol/l トリス/HCl pH7.5で透析した再生溶液もDRG 検査とその結果を比較するために用いた。さもないければ、再生溶液を遠心により不純物を除去した直後に用いた。ELISAによる再生β-NGFを測定するために、0.3 μg 抗体/ml, 50 mmol/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1%アジ化ナトリウム、pH9.6からなる0.1 ml抗体溶液と各ウェルを4℃で16時間インキュベートすることにより、マウス 2.5S-NGF (Boehringer Mannheim Company) に対するモノクローナル抗体で96ウェルマイクロタイタープレート (Nunc-Immuno Company; Maxisorp F96 型) を塗布した。0.2 mlの50 mmol/l トリス/HCl, 0.2 mol/l NaCl, 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0.2%トリトンX-100, 0.1%アジ化ナトリウム、pH7.0で3回洗浄した後、β-NGFを含む再生溶液およびその希釈物 (1%

BSA 補充の洗浄緩衝液で) の100  $\mu$ l アリコートを各ウェルに分注した。対応する透析し遠心した溶液を細胞検査と比較するために用いるか、さもなければ再生溶液を遠心による不純物除去の直後に用いた。濃度範囲0.1  $\mu$ g/ml-20pg/mlのマウス顎下腺からの2.5S-NGF (Boehringer Mannheim Company)の連続希釈も参照標準として各プレートで検査した。37°Cで2時間のインキュベーションの後、溶液を3回洗浄することにより取り除いた。続いて $\beta$ -ガラクトシダーゼと結合したマウス2.5S-NGFに対するモノクローナル抗体の溶液 0.1ml (Boehringer Mannheim Company; 1%BSAを含む洗浄緩衝液中の0.4U/ml)を各ウェルに加え、37°Cで4時間インキュベートした。【0039】さらに一巡の洗浄後、20mlの100 mmol/lヘベス、150 mmol/l NaCl, 2 mmol/l  $MgCl_2$ , 0.1%アジ化ナトリウム, 1% BSA, pH7中にクロロフェノール レッ

\*  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド 40 mg を有する溶液 0.2 mg で各ウェルを満たした。発色に依るが、試料の吸光度を10-60分後にELISA 読み取り機 (例えば、オーストリアのSLT-Lab instruments Company のType EAR400AT) で測定した。再生溶液中の $\beta$ -NGF濃度はマウスからの2.5S-NGFによる検量線に基づいて計算した。

【0040】以後特にことわらない限り、再生溶液を24時間のインキュベーション期間の後分析した。

表1 再生条件に関して $\beta$ -NGF-GSSG 誘導体 (C = 15 mg IB/ml)の再生収率の測定におけるDRG 検査と $\beta$ -NGF ELISAとの相互関係

全ての緩衝液は 0.1 mol/l トリス/HCl, 1 mmol/l EDTA を含み、20°CでpH8.0 であった。

【0041】補充物および変更したものは表に示されている。

誘導体溶液 の希釈	再生緩衝液 補充物	DRG 検査 での活性	ELISA <sup>*</sup> シグナル
1/20	—	+	$\leq$ 5 %
1/20	1 mmol/l GSH	++	25 %
1/20	1 mmol/l GSH+0.5 mol/l Arg	+++	100 %
1/20	1 mmol/l GSH+1.0 mol/l Arg	++	75 %
1/20	1 mmol/l GSH+1.0 mol/l Arg pH 7.0	++	31 %
1/20	1 mmol/l GSH+1.0 mol/l Arg pH 9.0	++	48 %
1/100	—	+	$\leq$ 5 %
1/100	1 mmol/l GSH	+	20 %
1/100	1 mmol/l GSH+0.5 mol/l Arg	++	76 %
1/100	1 mmol/l GSH+1.0 mol/l Arg	++	46 %
1/100	1 mmol/l GSH+1.0 mol/l Arg pH 7.0	++	36 %
1/100	1 mmol/l GSH+1.0 mol/l Arg pH 8.0	++	52 %
1/100	1 mmol/l GSH+0.5 mol/l Tris/HCl	/	33 %
1/100	1 mmol/l GSH+1.0 mol/l Tris/HCl	/	91 %
1/100	1 mmol/l GSH+1.0 mol/l Tris/HCl +0.5 mol/l Arg	++	100 %

\* ELISA の値を、各々同一の希釈での最大シグナルに関連させた。

表2 再生中における再生収率の温度への依存

6 mol/l GdnCl, 2 mmol/l EDTA, pH3 で透析された50mg IB/ml を有する可溶化物を0.7 mol/l Arg, 2.0 mol/l尿※

※素、0.1 mol/l トリス、2 mmol/l EDTA, 5 mmol/l システアミン、1 mmol/l シスタミン中で 100倍に希釈することにより、再生を行う。再生 $\beta$ -NGFをELISA により測定した。

温 度	再生時間 (h)	$\beta$ -NGF mg/l
4°C	10	0.8
4°C	24	1.4
4°C	48	2.6

	(9)	特開平6-327489
15		16
20°C	10	0.17
20°C	24	0.4
20°C	48	0.4

表3 可溶化物と誘導体の再生収率の、再生溶液中の酸化還元系への依存  
種々の酸化還元成分を含み、5mg/mlのタンパク質濃度を有する誘導体および可溶化物を透析前および後に、0.5 \* mol/l Arg, 0.1mol/l トリス/HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.5中で1/100 に希釈した。  
【0042】収率をβ-HGF ELISAで測定し、最大収率を有する調製物に対して標準化した。

変性β-HGF	酸化還元成分	相対的収率 (%)
GSSG 誘導体	0.5 mmol/l GSH	61
GSSG 誘導体	0.5 mmol/l システアミン	63
GSSG 誘導体	0.5 mmol/l システイン	51
システアミン 誘導体	0.5 mmol/l GSH	28
システアミン 誘導体	0.5 mmol/l システアミン	41
システアミン 誘導体	0.5 mmol/l システイン	35
透析してない可溶化物	2 mmol/l シスタミン	99
透析してない可溶化物	10 mmol/l シスタミン	50
透析後の可溶化物	5 mmol/l GSH/1 mmol/l GSSG	35
透析後の可溶化物	5 mmol/l システアミン + 1 mmol/l シスタミン	100
透析後の可溶化物	3 mmol/l GSH/1 mmol/l GSH	67
透析後の可溶化物	3 mmol/l システアミン + 1 mmol/l シスタミン	99

#### 実施例5

##### rec.β-NGFのバルス再生

IB物20g を400 mlの6 mol/l GdmCl, 0.1 mol/l トリス/HCl, 0.1 mol/l DTE, 2mmol/l EDTA, pH8.5 中に溶解し、20°Cで1時間インキュベートした。続いて、溶液のpHを25% HCl でpH3 に調整し、4 °Cで10 l の6 mol/l Gd mCl, 2 mmol/l EDTA, pH3 で3度透析した。透析物の10\*

※0 mlアリコートをして12-16時間の間隔で、30分以内に4 °C で20 l の0.7 mol/l Arg, 2 mol/l尿素、0.1 mol/l トリス、2 mmol/l EDTA, 5 mmol/l システアミン、1 mmol/l シスタミン、pH9.1 にポンプを用いて注入した。表4 種々の量の透析した可溶化物の添加後、再生調製物中のELISAによるβ-NGF濃度

バルス数	添加した可溶化物	β-NGF 濃度 (mq/l)
1	100 ml	3.5
2	200 ml	5.3
4	400 ml	8.5

#### 実施例6

再生溶液からの生物学的に活性のあるrec.β-NGFの精製  
固体硫酸アンモニウムを実施例5で調製した再生溶液に20%の飽和になるまで少しずつ添加し、氷上で1時間攪拌した。続いて溶液のpHを25 % HClでpH3 に調整した。

30分のインキュベーションの後、それを7N NaOH でpH8 に滴定した。混濁は遠心 (4 °C, 20,000g で1時間) または、低タンパク質吸着を有する好適な膜を通する過 (例えば、日本のKuraray Co. Ltd.のEvaflux 4A中空ファイバー・カートリッジ) により取り除いた。続いてβ

-HGFを含有する澄んだ溶液を50 mmol/l トリス/HCl, 1 mmol/l EDTA, 20 %飽和の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.5 で前もって平衡した TSKブチルカラム (Pharmacia Company)にかけた。試料をかけるのが終了した後、それをブロッターがベースラインに達するまで50 mmol/l トリス/HCl, 1 mmol/l EDTA, pH7.5で洗浄した。溶出を50 mmol/l の酢酸ナトリウム、1 mmol/l EDTA, pH4.5中の50%エチレングリコールで行った。溶出したフラクションのβ-NGFの含有量をELISAを用いて検査した(実施例4参照)。β-NGFを含むフラクションをブールし、0.5 mol/l NaCl, 50 mmol/l リン酸ナトリウム、10%グリセロール、1 mmol/l

表5 ELISA で測定された20 l 再生溶液からのrec.β-NGF精製収率

精製ステップ	β-NGF (mg)	収 率 (%)
再生溶液	170	100
TSK-ブチル前	143	84
TSK-ブチル後	92	54
S200後	80	47
S-セファローズ後	61	36

#### 実施例7

##### 精製 rec. β-NGFの特徴決定

##### a) UV分光光度計による濃度の測定

精製試料中のβ-NGFの濃度を測定するために、50 mmol/l トリス/HCl, 1 mmol/l EDTA, pH7.5で透析した試料の240-340nmのUVスペクトルをUV/Vis分光光度計(例えば、USAのHewlett-Pac, ... Co. のダイオードアレイ分光光度計Type HP8452A)で測定した。溶液中のβ-NGF濃度を280 nmでの試料の吸光度から計算した。この目的のために、この波長で吸収するアミノ酸の含有量から生じる、理論的モル吸光係数である21200 ± 100M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (We tlauffer, D.B., 1962, Adv. in Protein Chemistry, Vol. 17, 375-383; Gill, S.C. and von Hippel, P.H., Anal. Biochem. 182, 319-326)を用いた。14000Dを分子量として用いた。吸光度により計算された値は、ELISAにより測定されたそれよりも約50%低いβ-NGF濃度を示した。この考えられる理由は参照標準として用いられた(マウスからの)2.5 S-NGFの純度が低いので、ELISAで測定された値が、rec.β-HGFについて非常に高くなるのである。

##### b) 純度の分析およびSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分子量の測定

Midgetシステム (Pharmacia Co, Sweden) の17%ゲルを用いた。280 nmでの吸光度およびマウスの顎下腺からの2.5 S-NGF 8.4 μg または2.1 μg に基づいて計算された試料は各々10 mmol/l DTE およびrec.β-NGF 6 μg または1.5 μg 含んでいた。予想されたように Rec. β-NGFは、約12.5 KDの2.5 S-NGF よりも約15KDのいくらか

\*ol/l EDTA, pH6.0で平衡化したセファクリルS200カラム (Pharmacia Company, Sweden)にかけた。カラムを同じ緩衝液で溶出した。

【0043】β-NGFを含む溶出物中のフラクションを15 mSの導電性があるように水で希釈し、20 mmol/l リン酸ナトリウム、1 mmol/l EDTA, pH6.0で平衡したSセファローズカラム (Pharmacia Co.)にかけた。続いて、それを平衡緩衝液で洗浄した。溶出は上記緩衝液中の1.2 mol/l NaClまでの勾配で行った。β-NGFを含むフラクションをブールし、続いて分析を必要とする場合は、それらを透析により再度緩衝液処理した。

大きい分子量を有している。ダイマー rec. β-NGFの分子量範囲において種々の強度を有するバンドがあることは試料調製および試料の年齢に関係しており、試料調製中のジスルフィド架橋を有する分子の形成によるものである。rec.β-NGFを有するゲルレーンのデンストメーターの測定 (Vitrascan XLレーザーデンストメーター、Pharmacia Co. Sweden) は93%モノマーおよび7%ダイマーを示した。

##### c) RP C18-HPLC を用いる純度の分析

20 μg のrec.β-NGFを0.1 % TFA で平衡化したVydac 300, C18, 5 μ, 125 × 4 mmカラムにかけ、0-40% B (B = アセトニトリル/0.1% TFA)の段階勾配で20分間そして40-100% B で20-25 分間、1 ml/分の流速で溶出した。280 nmで励起した後、340 nmでの蛍光発光 (Merck/Hitachi F-1050蛍光分光光度計)を検出に用いた。溶出曲線を統合すると92%の純度を得た。同じ様な結果は280 nmでのUV検出により得られた。β-NGFとしての溶出ピークの同定は、集めて、Speed Vac により濃縮した後ELISA およびN末端配列決定により調べた。

##### d) SEC-HPLCを用いたrec.β-NGFの純度分析

280 nmで1.3 の吸光度を有する精製rec.β-NGF溶液30 μl をスーパーローズ-6カラム、Type HR 10/30 (Pharmacia Co. Sweden)にかけ、0.7 mol/l アルギニン、0.1 mol/l トリス、pH8.5を用い、0.5 ml/分の流速で溶出した。280 nmでの吸光度を検出した。図9はマウスの2.5 S-NGF 試料と比較した溶出曲線を示す。

##### e) N末端配列分析

RP-HPLC により単離され、続いて実施例7cにより濃縮さ

れた $\beta$ -NGFをN末端配列分析に用いた。N末端配列を、ガス相、タンパク質配列分析装置(モデル477A, USAのApplied Biosystems Co)を用いて決定した。PTH アミノ酸当り約400 pmolの信号強度で下記の配列を見出した。

[0044]

H<sub>2</sub>N-Ser-Tyr-Gln-Arg-Thr-His-Arg-Ser (配列番号 7)  
E.coliにおいてN末端アミノ酸メチオニンは、すでに明らかに切断されている。

f) rec.  $\beta$ -NGFの生物学的活性と抗 $\beta$ -NGF抗体によるその阻害

\*  $\beta$ -NGFの生物学的活性測定のためのDRG 検査を実施例4に記載されているように行った。用いられた試料は280 nmでの吸光度およびマウスの顎下腺からの2.5S-NGF によるタンパク質測定した後、単離されたrec.  $\beta$ -NGFであった。試料を培地で希釈して200, 20 および20 ng/mlにし、その100  $\mu$ lのアリコートを750  $\mu$ lの培地と混合し、150  $\mu$ lの細胞懸濁物をインキュベートした。阻害のために、検査混合物中の抗体濃度が200 ng/ml になるようにモノクローナル抗- $\beta$ -(2.5S) NGF 抗体を含む培地を用いて細胞検査を行った。結果は表6に示されている。

表6 rec.  $\beta$ -NGFの生物学的活性および抗- $\beta$ -NGF抗体によるその阻害

$\beta$ -NGF種	$\beta$ -NGF濃度 (ng/ml)	抗体 (ng/ml)	生物学的活性
rec. $\beta$ -NGF	20.0	—	+++
rec. $\beta$ -NGF	2.0	—	+++
rec. $\beta$ -NGF	0.2	—	++
rec. $\beta$ -NGF	20.0	200	+/-
rec. $\beta$ -NGF	2.0	200	-
rec. $\beta$ -NGF	0.2	200	-
2.5 S $\beta$ -NGF	20.0	—	+++
2.5 S $\beta$ -NGF	2.0	—	++
2.5 S $\beta$ -NGF	0.2	—	++
2.5 S $\beta$ -NGF	20.0	200	+
2.5 S $\beta$ -NGF	2.0	200	-
2.5 S $\beta$ -NGF	0.2	200	-

#### 実施例8

##### N-末端短縮のrec. $\beta$ -NGF分子の生成および特徴決定

N末端短縮 rec.  $\beta$ -NGF分子を生成するために、精製した試料を50 mM トリス/HCl, pH 7.7で透析した。濃度は、280 nmでの試料の吸光度により0.7mg/mlと測定された(実施例7a参照)。

[0045] 短縮rec.  $\beta$ -NGF分子を下記の消化混合物中でエンドプロテイナーゼトリプシンおよびArg C で消化することにより生成した。

a) rec. NGF+トリプシン: 22°C

200  $\mu$ l のrec.  $\beta$ -NGF透析物

+60  $\mu$ l のトリプシン配列等級溶液

(100  $\mu$ g/200  $\mu$ l, 0.1 mol/l トリス, pH8.0)

b) rec. NGF+エンドプロテイナーゼArgC: 37°C

200  $\mu$ l rec.  $\beta$ -NGF透析物

+20  $\mu$ l の50 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 50 mmol/l DTE, 100 mmol/l トリス/HCl, pH7.6

+40  $\mu$ l のエンドプロテイナーゼArg C 溶液

(40  $\mu$ l の250 mmol/l トリス/HCl, 25mmol/l DTE, 2.5 mmol/l EDTA, 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 7.8 中に20  $\mu$ g)

c) プロテアーゼなしのrec.  $\beta$ -NGF: 22 °C

200  $\mu$ l のrec.  $\beta$ -NGF透析物

+60  $\mu$ l の50 mmol/l トリス/HCl, pH 7.7

さらに、rec.  $\beta$ -NGFの代りに透析緩衝液を含む、類似の対照溶液とプロテアーゼと共に調製した。混合物を対応する温度で5時間インキュベートした。続いて、混合物各々200  $\mu$ l を20 mmol/l リン酸ナトリウム, pH 6.0で平衡化したモノSカラムType HR 5/5 (Pharmacia Co.) へ1 ml/分の流速で加え、0-1.2 mol/l NaClの直線勾配で溶出した。280 nmでの吸光度を検出した。プロテアーゼのみを有する対照混合物は、最初の10分以内クロマトグラフィーで溶出されるものであることを示した。短縮に依るが、 $\beta$ -NGFを含むフラクションは、少なくとも滞留時間10分まで溶出しなかった。rec.  $\beta$ -NGFを含む消化混合物のクロマトグラフィーの溶出曲線は図10に示されている。各々の場合において13-19 分の滞留時間を有

する溶出ピークを集めた。トリプシンを有する消化混合物の2つのピークを別々に集めた。

【0046】集めたピークのフラクションにおける $\beta$ -NGF濃度を、280 nmでの試料の吸光度により測定した。rec.  $\beta$ -NGFを含む溶液各々の1 nmolをRP-C18 HPLCにより濃縮し、N-末端配列をガス相配列決定により決定した。さらに、短縮 $\beta$ -NGF分子の生物学的活性を測定する\*

\* ために集めたフラクションの試料をDRG検査の20, 10および5 ng/mlの $\beta$ -NGF濃度に希釈した。抗 $\beta$ -NGF抗体による生物学的活性の阻害を実施例7fに記載されているように行った。

【0047】配列分析および細胞検査の結果は表7および8に要約されている。

表7 タンパク質分解における短縮 $\beta$ -NGF分子のN末端配列

用いられた プロテアーゼ	モノSでの $\beta$ -NGFの 滞留時間	N - 末端配列	最初のA.A. の位置*
—	18.5 分	Ser Tyr Gln Arg Thr His Arg Ser (配列番号7)	- 9
トリプシン	13.4 分	Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser (配列番号8)	+10
トリプシン	14.2 分	Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His (配列番号9)	+ 1
Arg C	14.6 分	Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His (配列番号10)	+ 1

\* 各々の場合において、最初に同定されたアミノ酸 ※を表す。

(=A.A.)の記載された位置は、図2中のアミノ酸の番号 ※

表8 DRG 検査におけるN末端短縮 $\beta$ -NGFの生物学的活性

$\beta$ -NGF種	$\beta$ -NGF濃度 (ng/ml)	抗 体 (ng/ml)	生物学的活性
rec. $\beta$ -NGF (未消化)	20	—	+++
	10	—	+++
	20	200	-
トリプシン 消 化 ピーク 13.4 分	20	—	+++
	10	—	+++
	20	200	-
トリプシン消化 ピーク 14.2 分	20	—	+++
	10	—	+++
	20	200	-
Arg C 消 化	20	—	+++
	10	—	+++
	20	200	-

#### 配 列 表

(1) 一般情報:

(i) 出願人:

(ii) 発明の名称:

(iii) 配列の数: 10

(iv) コンピュータ読み取り形式: 該当せず

(v) 現在の出願データ: 出願番号:

(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列の特徴:

50 (A) 長さ: 129 アミノ酸

(13)

特開平6-327489

23

24

(B) 型: アミノ酸

\* (xi) 配列: 配列番号 NO:1:

(C) 鎖の数: 一本鎖

[0048]

(D) トポロジー: 直鎖状

[化1]

(ii) 配列の種類: タンパク質

\*

Met Ser Tyr Gln Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro  
 1 5 10 15  
 Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp  
 20 25 30  
 Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met  
 35 40 45  
 Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe  
 50 55 60  
 Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr  
 85 90 95  
 Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe  
 100 105 110  
 Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val  
 115 120 125  
 Arg

[0049] (2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 7 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号 NO:2:

[0050]

[化2]

Arg Thr His Arg Ser Lys Arg  
 1 5

[0051] (2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 3 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号 NO:3:

[0052]

[化3]

Ser Tyr Gln  
 1

\*

AATTCTTATG TCTTACCAAA GAACTCACCG TAGCAAGCGC

[0057] (2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 40 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

50 (D) トポロジー: 直鎖状

※ [0053] (2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 5 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

30 (xi) 配列: 配列番号 NO:4:

[0054]

[化4]

Ser Tyr Gln Val Ile  
 1 5

[0055] (2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 40 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

40 (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号 NO:5:

[0056]

[化5]

(xi) 配列: 配列番号 NO:6:  
【0058】

\*【化6】  
\*

ATGAGCGCTT GCTACGGTGA GTTCTTTGGT AAGACATAAG

【0059】(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 8 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号 NO:7:

【0060】

【化7】

Ser Tyr Gln Arg Thr His Arg Ser  
1 5

【0061】(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 8 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号 NO:8:

【0062】

【化8】

Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser  
1 5

【0063】(2) 配列番号9の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 8 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号 NO:9:

【0064】

【化9】

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
1 5

【0065】(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 8 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

10 (ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号 NO:10:

【0066】

【化10】

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
1 5

【図面の簡単な説明】

【図1】この場合には本発明のプラスミドpNGF1を略図形態で示す図。

【図2】本発明の組み換え $\beta$ -NGFの一次構造を示す図。

20 【図3】再生溶液中のグアニジウム塩酸塩濃度に対する再生収率の依存性を示す図。

【図4】再生溶液中のタンパク質濃度に対する再生収率の依存性を示す図。

【図5】再生溶液のpHに対する再生収率の依存性を示す図。

【図6】組み換え $\beta$ -NGFのUVスペクトルを示す図。

【図7】組み換え $\beta$ -NGFのSDSゲルのクーマシーブルー染色を示す図。

30 【図8】修飾された(N-末端で延長された)組み換え $\beta$ -NGFのHPLC分離ダイアグラムを示す図。

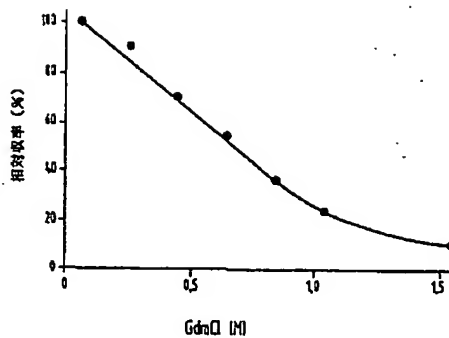
【図9】組み換え(N-末端で延長された) $\beta$ -NGF(図9a)およびマウスからの2.5 S-NGF(図9b)のスペロース6分離ダイアグラムを示す。

【図10】未消化の組み換え $\beta$ -NGFのモノS分離ダイアグラムを示す図。

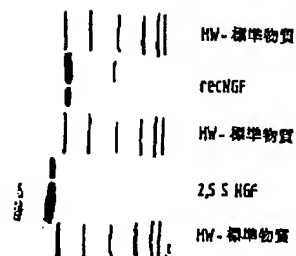
【図11】トリプシンによる消化後のダイアグラムを示す図。

【図12】エンドプロテイナーゼArg Cによる消化後のダイアグラムを示す図。

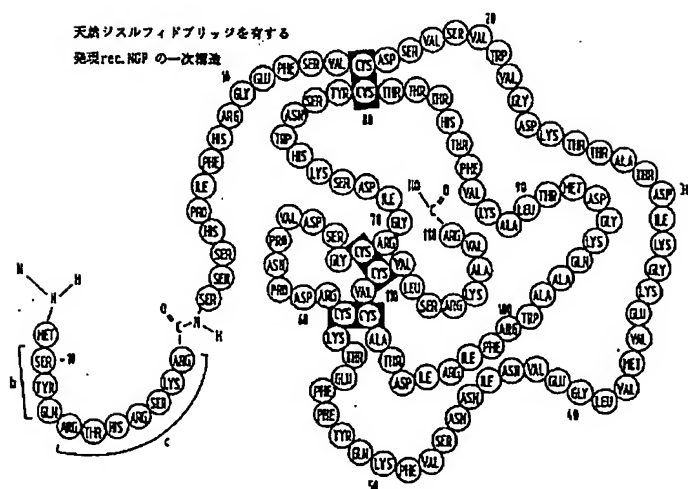
【圖3】



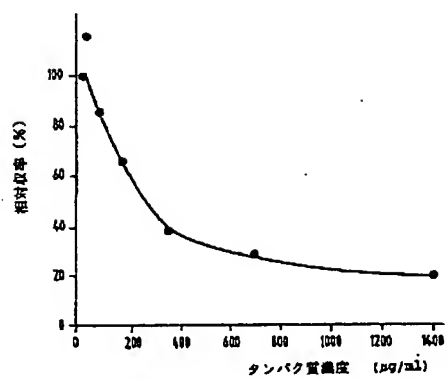
【圖7】



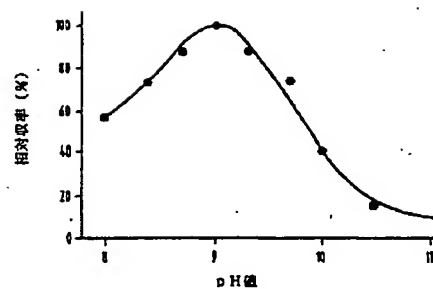
【図2】



【図4】



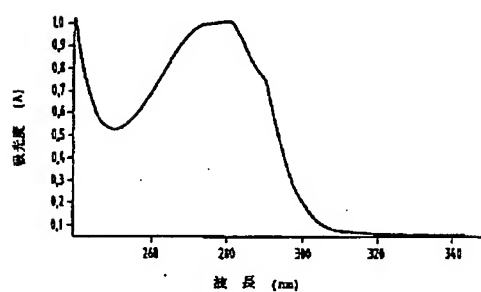
【図5】



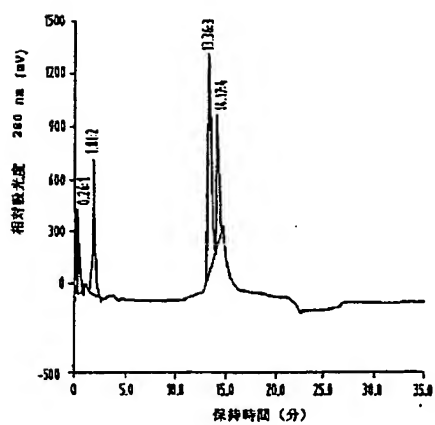
【図8】



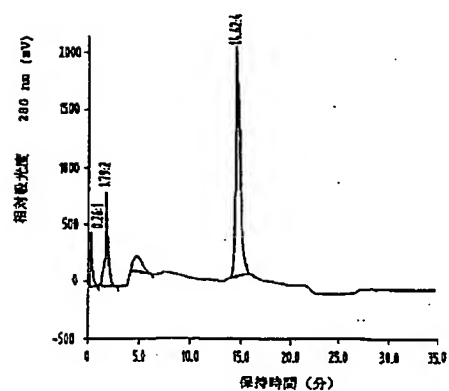
【図6】



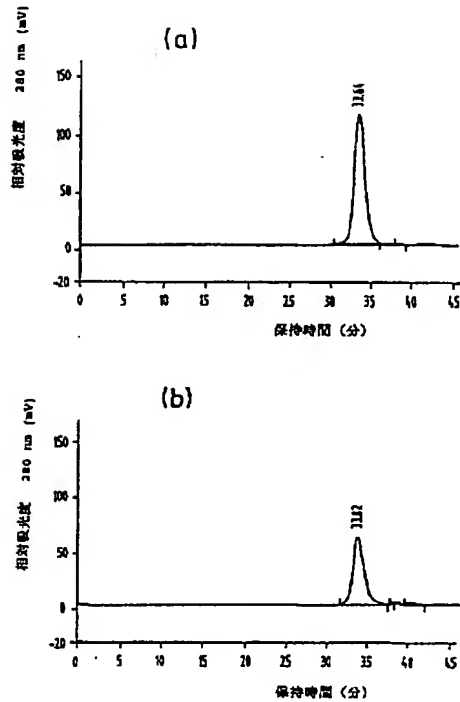
【図10】



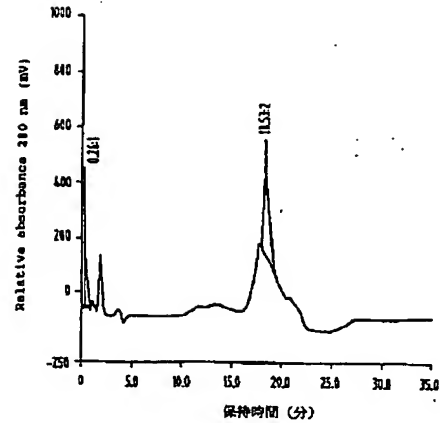
【図11】



【図9】



【図12】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/18				
// C 1 2 N 1/21		7236-4B		
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 クルト ナオヨクス  
ドイツ連邦共和国 8122 ベンツパーク  
ブーヘンシュトラッセ 3

(72)発明者 ライナー ルドルフ  
ドイツ連邦共和国 8120 ヴァイルハイム  
フェルベールガッセ 17  
(72)発明者 アンネ スターン  
ドイツ連邦共和国 8122 ベンツパーク  
カルヴェンデルシュトラッセ 10